

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 034 306
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 81100802.8

(22) Anmeldetag: 05.02.81

(51) Int. Cl.³: C 12 N 15/00

C 12 P 21/02, C 07 H 21/04
C 12 N 1/20, C 12 P 19/34
//C12R1/19

(30) Priorität: 16.02.80 DE 3005843

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
26.08.81 Patentblatt 81/34(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)(72) Erfinder: Groneberg, Jürgen, Dr.
Loreleistrasse 71
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)(72) Erfinder: Wengenmayer, Friedrich, Dr.
Theodor-Körner-Strasse 12
D-6238 Hofheim am Taunus(DE)(72) Erfinder: Hilfenhaus, Joachim, Dr.
Auf'm Gebrande 24
D-3550 Marburg 1(DE)(72) Erfinder: Winnacker, Ernst-Ludwig, Prof. Dr.
Elvirastrasse 4
D-8000 München 19(DE)

(54) Mikrobiologisch hergestelltes Polypeptid mit der Aminosäuresequenz des menschlichen Interferons, DNA und Plasmide, die für diese Sequenz codieren, Mikroorganismen, die diese genetischen Informationen enthalten, und Verfahren zu deren Herstellung.

(57) Ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, das die Aminosäuresequenz des menschlichen Interferons enthält, bei dem man die genetischen Informationen für die Biosynthese des genannten Polypeptids mittels Fibroblasten-mRNA gewinnt, aus dieser die cDNA herstellt, diese in einen Plasmid einführt, mit dem erhaltenen Hybridplasmid Mikroorganismen transformiert und durch Selektion und Kultivierung die das Polypeptid produzierenden Mikroorganismen gewinnt.

EP 0 034 306 A2

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT HOE 80/F 024

Dr.MD/jk

Mikrobiologisch hergestelltes Polypeptid mit der Aminosäuresequenz des menschlichen Interferons, DNA und Plasmide, die für diese Sequenz codieren, Mikroorganismen, die diese genetischen Informationen enthalten, und Verfahren zu deren Herstellung

Seit mehr als 20 Jahren ist bekannt, daß Interferon die Virusproduktion verhindert. Untersuchungen der letzten Jahre haben ferner ergeben, daß Interferon auch die Zellteilung inhibiert und viele Reaktionen des Immunsystems reguliert. Alle diese Ergebnisse unterstreichen die große medizinische Bedeutung des Interferons.

Die Mengen an Interferon, die bisher für wissenschaftliche und therapeutische Untersuchungen eingesetzt werden konnten, wurden aus Fibroblasten- und Lymphocyten-Kulturen gewonnen. Es gelang aber mit beiden Verfahren nicht, größere oder auch nur für einzelne Fragestellungen ausreichende Mengen an Interferon herzustellen. Dies ist zugleich der Grund dafür, daß der Erkenntnisstand auf dem Interferon-Gebiet nur sehr langsam voranschreitet und daß nur sehr wenige der dringend gewünschten Untersuchungen auf dem Krebsgebiet durchgeführt werden konnten. Es ist somit unabdingbar, neue Wege in der Produktion von Interferon zu beschreiten.

Einen solchen Weg zeigt die vorliegende Erfindung auf. Sie betrifft die Isolierung von Nukleotidsequenzen, die den genetischen Code für Interferon enthalten, die Synthese von DNA mit diesen spezifischen Nukleotidsequenzen und den Transfer dieser DNA in einen Mikroorganismus als Wirt, in dem die Replikation und Expression dieser DNA erfolgt.

Die vorliegende Erfindung betrifft im besonderen die

Darstellung von Genen für Fibroblasten-Interferon, den Transfer dieser Gene in einen mikrobiellen Wirt, Replikation von Wirt und Gen und Expression des Gens durch den Wirt. Dabei entsteht Interferon-Protein mit den für
5 dieses Protein charakteristischen biologischen und immunologischen Eigenschaften

Zur Erreichung des erfindungsgemäßen Zieles kann man in folgender Weise verfahren, wobei der aufgezeichnete Weg
10 beispielhaft für mehrere begangene steht.

Menschliche Fibroblasten werden in Gegenwart eines Protein-syntheseinhibitors mit Hilfe von Polyinosinsäure/Poly-cytidylsäure zur maximalen Produktion von Interferon-mRNA
15 angeregt. Die Zellen werden denaturiert und die RNA als Niederschlag nach einer Cäsiumchloridzentrifugation gewonnen. Nach weiterem Umfällen wird aus dieser RNA die mRNA über eine Oligo-dT-Cellulosesäule abgetrennt. Die gewonnene mRNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Trans-
20 criptase zu einem RNA-DNA-Doppelstrang komplettiert. Nach Verdauung des RNA-Stranges wird der DNA-Strang (die komplementäre DNA = cDNA) mit Reverser Transkriptase oder dem Enzym Polymerase I zum DNA-DNA-Doppelstrang (dsDNA) komplettiert.

25 Diese doppelsträngige DNA muß nun in ein Plasmid eingebaut werden. Dazu ist die Verlängerung des 3'-Endes der DNA z. B. mit dCMP-Resten notwendig. Das Plasmid (z.B. pBR 322) wird mit der Restriktionsnuklease PstI auf-
30 schnitten und z. B. mit dGMP-Resten verlängert. Bei Zusammengabe der so verlängerten DNA mit dem entsprechend verlängerten Plasmid erfolgt Basenpaarung zwischen DNA und Plasmid. Dieses zirkularisierte Molekül wird dann in Mikroorganismen (vor allem Bakterien, vorzugsweise E. coli, wie
35 E. coli K 12 oder λ 1776) transformiert; die noch nicht geschlossenen Bindungen werden durch die Enzyme des Mikro-

organismus kovalent geknüpft. Die transformierten Mikroorganismen, werden auf Agarplatten ausplattiert und auf Antibiotikaresistenzen, die durch das gewählte Plasmid und die eingesetzte Restriktionsnuklease gegeben sind, selektioniert.

Mit Hilfe immunologischer und biologischer Tests werden die Klone, die interferonhaltige Proteine exprimieren, herausgesucht. Diese Klone werden gezüchtet, die Mikroorganismenmasse abzentrifugiert, extrahiert und auf Interferongehalt getestet. Die durch Aufschluß der Interferon-produzierenden Klone gewonnene Lösung enthält Interferon-Protein.

Die erfindungsgemäßen Verfahren können in folgender Weise durchgeführt werden:

1. Verfahren zur Isolierung von RNA

20 a) Die Gewinnung von interferonproduzierenden Fibroblastenzellen

Menschliche, neonatale Vorhautfibroblasten werden bei 37°C unter Verwendung geeigneter Kulturmedien (z. B. Eagle's Medium MEM (minimum essential medium) plus foetales Kälberserum) in Rollflaschen (Ø 10 cm, Länge 40 cm) über mehrere Passagen vermehrt. Nach Erreichen ausgewachsener Zellkulturen der 25. bis 35. Zellverdopplung wird das Vermehrungsmedium durch das Interferoninduktionsmedium ersetzt. Dieses besteht aus Eagle's MEM, den geeigneten Mengen des Fibroblasten-Interferon-Induktors Poly-inosinsäure : Polycytidylsäure (10 - 100 µg/ml; im aktuellen Fall 50 µg/ml) und des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (10 - 100 µg/ml; im aktuellen Fall 50 µg/ml) zugesetzt werden. Nach Inkubation

der Zellkulturen bei 37°C über 4 bis 6 Stunden (im aktuellen Fall 5 Stunden) wird der Kulturüberstand abgegossen.

5 b) Gewinnung von RNA

Die erhaltenen Zellen werden in "denaturierendem Medium" (4 M Guanidiniumthiocyanat, 1 M Mercaptoäthanol, 0,15 M Natriumacetat - pH 5,5) aufgenommen und 1 Minute bei 0°C mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenat wird 15 Minuten bei 4°C mit 20 000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wird dann auf eine Lösung ("Kissen") aus 5 ml 5,7 M CsCl, 10 mM Tris-hydroxiaminomethan (Tris), 10 mM Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) vom pH 7,6 geschichtet und in einem Beckman-SW 27. Rotor 36 Stunden bei 20°C und 22 000 UpM zentrifugiert.

Es wurde gefunden, daß, im Gegensatz zu Angaben in der Literatur, ein Zusatz von CsCl zu dem Lysat vermieden werden muß, um eine möglichst vollständige Abtrennung der mRNA im folgenden Reaktionsschritt zu erreichen. Nach beendeter Zentrifugation werden die Polyallomer-Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und der Boden des Röhrchens, auf dem sich der RNA-Niederchlag befindet, abgeschnitten. Der Niederschlag wird in einer Lösung aus 10 mM Tris, 10 mM EDTA und 1 % "Sarkosyl" (N-Lauryl-Sarkosin-Na-Salz) vom pH 7,6 aufgenommen und die Suspension bei 20 000 UpM 20 Minuten abzentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag wird nochmals in dem gleichen Puffer aufgenommen, 5 Minuten auf 65°C erwärmt und erneut zentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden 0,3M an Natriumacetat gemacht, mit dem 2,5-fachen Volumen an Äthanol versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

2. Gewinnung von mRNA

Die RNA wird durch Abzentrifugation aus der äthanolischen Lösung (20 000 UpM, 30 Minuten, -5°C) abgetrennt und in 0,5M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5 gelöst. Diese Lösung wird auf eine Oligo-dT-Cellulose-Säule (Hersteller: Collaborative Research, Type 3), die mit dem gleichen Puffer äquibriert ist, aufgetragen und mit 1 mM Tris pH 7,6 oder destilliertem Wasser eluiert. Die Elution der Poly-A-haltigen RNA (mRNA) kann durch Extinktionsmessung bei 260 nm verfolgt werden. Die so erhaltene mRNA wird mit Natriumacetat bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M versetzt, das 2,5fache Volumen an Äthanol zugegeben und die Lösung bei -20°C aufbewahrt.

3. Gewinnung der cDNA

a) Gewinnung von Einzelstrang-cDNA

Die Übertragung der mRNA in die entsprechende DNA (cDNA) erfolgt mit Hilfe des Enzyms Reverser Transcriptase. Der Inkubationsansatz enthält:
50 mM Tris, pH 8,3, 10 mM MgCl_2 , 30 mM 2-Mercapto-äthanol, 0,5 mM an allen 4 üblicherweise vorkommenden Desoxyribonukleosidtriphosphaten (entsprechende Triphosphate von Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin), 100 $\mu\text{g/ml}$ Oligo-dT₁₂₋₁₈ (Hersteller: Boehringer Mannheim) etwa 100 $\mu\text{g/ml}$ polyadenylierte RNA und 800 Einheiten/ml Reverser Transcriptase (Hersteller: Life Science Inc., St. Petersburg, USA). Zur Verfolgung der Reaktion kann ein in α -Stellung mit ^{32}P -markiertes Desoxyribonukleosidtriphosphat (spez. Aktiv.: 50Ci/mMol) zum Ansatz gegeben werden. Das Gemisch wird 60 Minuten bei 42°C inkubiert, worauf durch Zusatz von 20 mM EDTA die Reaktion abgestoppt wird. Die Lösung wird mit einem gleichen Volumen mit Wasser gesättigtem Phenol extrahiert, das

Phenol durch Ausschütteln mit Äther entfernt und Reste Äther mit Stickstoff abgedampft. Nicht eingebaute Desoxyribonukleosidtriphosphate werden durch Säulenchromatographie an Sephadex G50 in 10 mM Tris, pH 9,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA abgetrennt. Die eluierte cDNA wird durch Zusatz von 0,3 M Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen Äthanol ausgefällt.

Nach Zentrifugation wird der Niederschlag in 0,1M NaOH aufgenommen und 20 Minuten bei 70°C inkubiert oder in 0,3M NaOH über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wird mit 1M HCl und 1M Tris auf pH 7,6 gebracht.

b) Bildung von Doppelstrang-cDNA (ds DNA)

Zur Synthese des zweiten DNA-Stranges kann wiederum das Enzym Reverse Transkriptase oder das Enzym Polymerase I verwendet werden.

Bildung der dsDNA mit Reverser Transcriptase:

Der Inkubationsansatz (pH 8,3) enthält 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 30 mM 2-Mercaptoäthanol, 0,5 mM der oben genannten 4 Desoxyribonukleosidtriphosphate, 50 µg/ml cDNA und 800 Einheiten/ml Reverser Transcriptase. Die Reaktion wird 120 Minuten bei 42°C durchgeführt und durch Zusatz von EDTA bis zur Endkonzentration von 20 mM abgestoppt. Anschließend erfolgt die Phenol-Extraktion und Gelpermeationschromatographie an Sephadex G50 wie vorher beschrieben.

Bildung der dsDNA mit Polymerase I:

Der Inkubationsansatz (pH 6,9) enthält 200 mM Hepes, 0,5 mM der obengenannten 4 Desoxyribonukleosidtriphosphate, 10 mM MgCl₂, 30 mM 2-Mercaptoäthanol und 70 mM KCl. Durch Zusatz von ³²P-markierten Desoxyribonukleotiden (an den α-Positionen) zum Inkubations-

ansatz kann die Reaktion verfolgt werden. Die Reaktion wird mit 800 Einheiten/ml Polymerase I gestartet und 2 Stunden bei 15°C durchgeführt. Durch Zusatz von 0,1 % Natriumdodecylsulfat und 100 µg/ml RNA wird die Reaktion abgestoppt. Die Lösung wird wie beschrieben extrahiert. Die nach der Extraktion erhaltene Lösung wird auf eine Sephadex G50 Säule aufgetragen und die Chromatographie mit 10 mM Tris pH 9,0, 100 mM NaCl und 1 mM EDTA durchgeführt. Die eluierte DNA kann durch die Radioaktivität bestimmt werden und wird durch Zusatz von 0,3 M Natriumacetat und 2,5-fachem Volumen Äthanol gefällt. Der Äthanol-Niederschlag wird in einer Lösung (pH 4,5) aus 300 mM NaCl, 30 mM Natriumacetat und 3 mM ZnCl₂ aufgenommen und mit 1500 Einheiten/ml S1 Nuklease (Boehringer Mannheim) versetzt. Die Reaktion wird nach einer Stunde bei 37°C durch Zusatz von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 20 mM beendet. Anschließend erfolgt Extraktion mit Phenol und Fällung mit Äthanol wie beschrieben.

c) Gewinnung von cDNA in einem "Eintopfverfahren"

Alternativ zu den beschriebenen Reaktionen kann die dsDNA aus der mRNA auch in einem "Eintopfverfahren" gewonnen werden. Dabei wird die Reaktion der Reversen Transcriptase wie beschrieben durchgeführt, zum Inkubationsansatz wird allerdings noch 140 mM KCl hinzugefügt. Nach beendeter Reaktion wird die Probe 4 Minuten auf 100°C erhitzt und der gebildete Niederschlag abzentrifugiert. Zu dem Überstand wird das gleiche Volumen an 0,4 M Hepes Puffer (pH 6,9) gegeben, wobei die oben genannten 4 Desoxyribonukleotide in dem Puffer 0,5 mM vorhanden sind. Durch Zugabe von 800 Einheiten/ml Polymerase I wird die Reaktion wie beschrieben bei 15°C durchgeführt und durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat und RNA abgestoppt. An-

schließlich wird wie unter 3.b) "Bildung der dsDNA mit Polymerase I" weiter verfahren.

4. Verlängerung der 3'-Enden von cDNA mit dCTP (Desoxycytosintriphosphat)

Zum Einbau in das Plasmid ist die Verlängerung des 3'-Endes der DNA mit einem der oben genannten 4 Desoxynukleotide notwendig. Ferner werden die 3'-Enden des geschnittenen Plasmids mit dem komplementären Desoxynukleotid verlängert. Bei Zusammengabe der DNA mit dem Plasmid erfolgt dann eine Basenpaarung zwischen DNA und Plasmid. Dieses wieder zirkularisierte Molekül kann zur Transformation von Bakterien eingesetzt werden; die noch nicht geschlossenen Bindungen werden durch ein Enzymsystem im Bakterium kovalent verknüpft.

Beispielsweise können die 3'-Enden der cDNA mit dCMP-Resten (Desoxycytosinmonophosphatreste) und das Plasmid mit dGMP-Resten (Desoxiguanidinmonophosphat-Reste) verlängert werden. Bei Verwendung dieser Desoxynukleotide in der beschriebenen Weise und bei Öffnung des Plasmids durch das Restriktionsenzym Pst I wird nach Einbau der fremden DNA eine Pst I-Spaltstelle an jeder Insertionsstelle neu gebildet, so daß nach Vermehrung des Plasmids die insertierte DNA zur weiteren Untersuchung leicht wieder mit dem Restriktionsenzym Pst I herausgeschnitten werden kann.

Der Niederschlag aus der Alkohol-Fällung nach Abbau mit S1 Nuklease wird in einer wäßrigen Lösung (pH 6,7) aus 30 mM Tris, 1 mM CoCl_2 , 140 mM Kalium-Kacodylat, 150 μM dCTP, 100 μg autoklavierten Gelatinehydrolisats und 0,1 M Dithioerythrit gelöst. Zur Verfolgung der Reaktion sollte ^{32}P -markiertes dCTP verwendet werden. Die Reaktion wird durch Zusatz von Terminaler Desoxynu-

kleotidyl-Transferase gestartet und für 10 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die Probe in Eis gestellt und durch Radioaktivitätsmessung im mit Trichloressigsäure fällbaren Niederschlag die Anzahl der eingebauten dCMP-Reste bestimmt. Bei der Reaktion sollten etwa 10 % der ursprünglich vorhandenen Nukleotide addiert worden sein; wenn dies nicht der Fall ist, kann durch Zusatz von weiterem Enzym die Reaktion fortgesetzt werden. Falls eine zu große Anzahl von dCMP-Resten addiert wurde, kann die entstandene Kette mit Hilfe des Enzyms S1 Nuklease verkürzt werden.

5. Verfahren zur Integration von DNA in ein Plasmid

Ein geeignetes zirkuläres Plasmid, beispielsweise pBR 322, wird mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten, welche nur eine Sequenz auf dem Plasmid erkennt. Günstig ist es, wenn diese Spaltstelle hinter einem starken oder induzierbaren Promotor liegt und/oder so lokalisiert ist, daß eine Antibiotikaresistenz beeinflußt wird.

Das solchermaßen linearisierte Plasmid wird dann an den 3'-Enden um eines der vier Desoxynukleotide verlängert.

Dies wird z. B. folgendermaßen durchgeführt:

30 µg Plasmid werden mit 50 Einheiten Pst I Restriktionsendonuklease in Gegenwart von 50 mM NaCl, 6 mM Tris, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-Mercaptoäthanol und 0,1 mg/ml Gelatine für 40 Minuten bei 37°C und einem pH-Wert von 7,5 inkubiert. Anschließend wird mit Phenol und Äther wie beschrieben extrahiert und das geschnittene Plasmid mit Äthanol in Gegenwart von 0,3 M Natriumacetat gefällt. Die Verlängerung der 3'-Enden des Plasmids mit dGTP (Desoxiguanidintriphosphat) erfolgt analog zu der oben beschriebenen Verlängerung der cDNA mit dCTP.

Die verlängerte Plasmid-DNA wird dann in einer Lösung (pH 8,0) aus 0,1 M NaCl, 10 mM Tris und 1 mM EDTA mit der verlängerten ds cDNA vermischt, für 2 Minuten auf 56°C erwärmt, 2 Stunden bei 42°C inkubiert und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die solchermaßen erhaltene hybride DNA wird dann zur Transformation von E. coli verwendet.

6. Klonierung des Hybridplasmids in E. coli

Die Bakterien, beispielsweise E. coli λ 1776, wurden bei 37°C in 50 ml eines üblichen Nährmediums bis zu einer optischen Dichte von $A_{600} = 0,5 - 0,6$ wachsen gelassen, sedimentiert, einmal mit 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen und dann in 40 ml einer Lösung aus 75 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 und 5 mM Tris vom pH 8,0 resuspendiert und 20 Minuten in Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen sedimentiert und in 2 ml 75 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 5 mM Tris pH 8,0 resuspendiert.

0,2 ml dieser Bakteriensuspension wurden dann mit 0,1 ml Hybrid-DNA-Lösung vermischt und 45 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde für 90 Sekunden auf 42°C erwärmt und anschließend mit 0,2 ml Nährmedium vermischt.

50 μ l-75 μ l dieser Suspension wurden dann auf Tetracyclin und Ampicillin enthaltende Agarplatten ausplattiert und auf Antibiotikaresistenz selektioniert.

7. Isolierung von Stämmen, die interferonenthaltende Proteine produzieren

a) Immunologischer Nachweis

Mit Hilfe eines von Broome und Gilbert (Broome, S. und Gilbert, E. PNAS 75, 2746, 1978) entwickelten Testsystems wurden die Klone auf die Expression interferonenthaltender Proteine untersucht. Klone, die interferonenthaltende Proteine exprimieren, werden

durch die Bindung von radioaktivem Antikörper an diese Proteine mit nachfolgender Autoradiographie dadurch erkenntlich, daß der Röntgenfilm an dieser Stelle geschwärzt wird. Dazu wurden bis zu 50 Klone pro Nitrocellulosefilter für 2 Tage bei 37°C wachsen gelassen. Dann wurden die Filter auf einen Agarblock gelegt, welcher 1 mg/ml Lysozym enthielt; auf die Bakterienkolonie wurde eine mit Interferon-antikörper beschichtete PVC-Folie aufgebracht, und dann wurde für 2 - 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Die PVC-Folie wurde anschließend für 15 Stunden bei 4°C in einer Lösung von ^{132}Jod -markiertem Interferon-antikörper inkubiert. Die spezifische Aktivität der Lösung war ca. 1×10^6 cpm/ml. Nach dem Waschen und Trocknen der Folien wurden diese autoradiographiert.

b) Biologischer Nachweis

Die Klone wurden in 50 ml eines üblichen Nährmediums bei 37°C über Nacht gezüchtet. Dann wurden die Bakterien sedimentiert, zweimal mit kalten 10 mM Tris pH 8,0, 30 mM NaCl gewaschen und in 20 % Saccharose in 30 mM Tris pH 8,0 1 mM EDTA resuspendiert. Es wurde dann bei Raumtemperatur für 10 Minuten geschüttelt, sedimentiert, in eiskaltem H_2O resuspendiert und im Eisbad für 10 Minuten inkubiert. Die Bakterien wurden dann sedimentiert und der Überstand in an sich bekannter Weise in einem Virusinhibitionstest auf den Gehalt an interferonhaltigem Protein getestet.

30 8. Gewinnung von Interferon-Protein

Die Klone, die in den verschiedenen Tests Interferonaktivität zeigen, werden in den üblichen Nährmedien gezüchtet, die Bakterien werden abzentrifugiert und mit wäßrigen Puffern extrahiert. Die Extraktionslösung enthält das Interferonprotein.

Patentansprüche

1. Mikrobiologisch hergestelltes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz des menschlichen Interferons ganz oder teilweise enthält.
- 5 2. Mikrobiologisch hergestelltes Polypeptid nach Anspruch 1, das die Aminosäuresequenz des menschlichen Fibroblasten-Interferons ganz oder teilweise enthält.
- 10 3. cDNA, die für Aminosäuresequenzen des menschlichen Interferons gemäß Ansprüchen 1 bis 2 codiert, hergestellt mittels mRNA aus menschlichen Fibroblasten-Zellen.
- 15 4. Plasmid, das für Aminosäuresequenzen des menschlichen Interferons gemäß Ansprüchen 1 bis 2 codiert, hergestellt aus der cDNA gemäß Anspruch 3 und einem Plasmid, vorzugsweise dem Plasmid pBR 322.
- 20 5. Mikroorganismus, insbesondere E. coli, mit der genetischen Information für die Biosynthese des Polypeptids von Ansprüchen 1 bis 2.
- 25 6. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids gemäß den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die genetische Information für die Biosynthese des Polypeptids mittels Fibroblasten-mRNA gewinnt, das erhaltene Gen in an sich bekannter Weise in Mikroorganismen einbringt und diejenigen Mikroorganismen in an sich bekannter Weise herausselektioniert und
30 kultiviert, die dieses Polypeptid produzieren.

7. Verfahren zur Herstellung von cDNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man aus Fibroblasten RNA gewinnt, daraus die mRNA isoliert und mittels dieser in an sich bekannter Weise cDNA herstellt.
- 5 8. Verfahren zur Herstellung des Plasmids von Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Plasmid, vorzugsweise den Plasmid pBR 322, mit der cDNA gemäß Anspruch 3 kombiniert.
- 10 9. Verfahren zur Herstellung eines Mikroorganismus gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Mikroorganismus, vorzugsweise E. coli, mit einem Plasmid gemäß Anspruch 4 transformiert.
- 15 10. Verfahren zur Gewinnung von RNA, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Cäsiumchlorid-freies Lysat auf eine wäßrige konzentrierte Cäsiumchloridlösung aufschichtet, zentrifugiert und die RNA gewinnt.

Patentansprüche für Österreich

1. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Mikroorganismus, der die genetischen Informationen für die Biosynthese des Polypeptids mit der Aminosäuresequenz des menschlichen Interferons ganz oder teilweise enthält, kultiviert und das von dem Mikroorganismus gebildete Polypeptid isoliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Mikroorganismus, der die genetischen Informationen für die Biosynthese des Polypeptids mit der Aminosäuresequenz des menschlichen Fibroblasten-Interferons ganz oder teilweise enthält, kultiviert und das so erzeugte Polypeptid isoliert.
3. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids gemäß Ansprüchen 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß man die genetischen Informationen für die Biosynthese des Polypeptids mittels Fibroblasten-m RNA gewinnt, das erhaltene Gen in an sich bekannter Weise in Mikroorganismen einbringt und diejenigen Mikroorganismen herausselektioniert und kultiviert, die das Polypeptid produzieren.
4. Verfahren zur Herstellung von cDNA, die für Aminosäuresequenzen des menschlichen Interferons codiert, dadurch gekennzeichnet, daß man aus Fibroblasten RNA gewinnt, daraus die mRNA isoliert und mittels dieser in an sich bekannter Weise cDNA herstellt.
5. Verfahren zur Herstellung eines Plasmids, der für die Aminosäuresequenz des menschlichen Interferons codiert, dadurch gekennzeichnet, daß man die nach Anspruch 4

hergestellte cDNA mit einem Plasmid, vorzugsweise dem Plasmid pBR 322, kombiniert.

- 5 6. Verfahren zur Herstellung des gemäß Ansprüchen 1 bis 2 eingesetzten Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Mikroorganismus, vorzugsweise E.coli mit einem Plasmid, der gemäß Anspruch 5 hergestellt wurde, transformiert.
- 10 7. Verfahren zur Gewinnung von RNA, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Cäsiumchlorid-freies Lysat auf eine wäßrige konzentrierte Cäsiumchloridlösung aufschichtet, zentrifugiert und die RNA gewinnt.